

Test de antígeno de flujo lateral para el diagnóstico de la infección de SARS-CoV-2



Diseñado y fabricado por: Linkcare Bioscreening. Barcelona
Producto: SARS-CoV-2 antigen test
Recogida de muestra: Frotis nasal anterior
Método de comparación: TMA, RT-PCR y RT-PCR (≤ 30 Ct)

Resumen

El principal problema para el control de la pandemia COVID-19 ha sido la rápida detección de casos dado el periodo pre-sintomático infeccioso. La disrupción de los test rápidos de antígenos por flujo lateral permite implementar una capa de seguridad rápida, económica y eficiente frente en el control de personas con altos niveles de carga vírica de beta-coronavirus SARS-CoV-2 en vía respiratoria superior sin importar la sintomatología.

El análisis clínico comparativo entre el test rápido de antígeno (TRA) SARS-CoV-2 de Linkcare (*Linkcare Bioscreening SARS-CoV-2 Antigen Test Kit*) y la técnica diagnóstica TMA (*Transcription Mediated Amplification*), revelan una alta eficiencia del test detectando al 83% de los casos con un valor predictivo positivo del 97%.

La sensibilidad del test de antígeno se incrementa al 90% al comparar respecto un método cuantitativo como la prueba RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) de GenXpert de Cepheid. Esta PCR tiene una sensibilidad del 99.5%¹ frente a SARS-CoV-2 estableciendo un punto de corte a los 39 ciclos de amplificación (*Cycle threshold* ó Ct) que permite establecer un límite de detección alrededor de 0.0200 to 0.0001 PFU/ml². La sensibilidad de la prueba se incrementa al 100% (CI: 86% - 100%) si el TAR tiene el propósito de detectar personas con alta carga vírica en vía respiratoria superior o igual a treinta (Ct ≤ 30) y por ello alta capacidad de infectiva.

La toma de muestra nasal anterior, método autorizado por la agencia americana *Food and Drug Administration* (FDA) para la recogida de muestra y análisis de PCR con GenXpert³, ha demostrado ser un mecanismo sencillo y rápido con mayor aceptación que otras técnicas por ser poco invasivo y eficiente para la detección de SARS-CoV-2. La toma de muestra nasal abre la posibilidad de prescindir de un sanitario para la toma de muestra o a la realización del auto test que permite incrementar el uso y la sensibilidad de la prueba por repetición.

Antecedentes

El coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2), fue identificado por primera vez el noviembre de 2019 en Wuhan, China. Este coronavirus es el causante de la enfermedad Covid-19 cuya expansión mundial convirtió en una pandemia.

El creciente uso de pruebas de la detección del SARS-CoV-2 es un factor importante para el control de la pandemia mediante estrategias de Prueba, Rastreo y Aislamiento (TTI, *Test Trace Isolate*). La disponibilidad de test rápidos de antígeno permite modificar estrategias

creando un régimen de pruebas regulares que funciona como un filtro frente SARS-CoV-2, identificando las personas con capacidad de transmisión tanto sintomáticas como asintomáticas, y permitiendo acciones inmediatas de aislamiento y trazabilidad.

Objetivo

Determinar el nivel de sensibilidad y especificidad del test rápido de antígeno Linkcare Bioscreening SARS-CoV-2, para evaluar su capacidad de detección en personas infecciosas.

Lugar del estudio

El estudio analítico se llevó a cabo en el Servei Andorrà d'Atenció Sanitària (SAAS), ubicado en el C/ dels Escalls s/n, AD700 Escaldes-Engordany, Andorra.

Materiales

Swab.

El hisopo de punta redonda utilizado para la recogida de las muestras nasales y orofaríngeas fue *PS Stick with Polyester Tipped Applicator 6" 2.5mm Steril* con referencia GW-1237AP lote 160420⁴.

Medio de transporte y conservación de muestras.

Las muestras de TMA i PCR transportadas hasta el laboratorio de análisis clínico de Hospital Nostra Senyora de Meritxell (HNSM), fueron almacenadas en el medio de transporte Microtest M4RT de la empresa Remel y conservadas a temperatura ambiente ($+18^{\circ}\text{C} \pm 3$) hasta su llegada al laboratorio donde se conservaron a temperatura refrigerada de ($+4^{\circ}\text{C} \pm 2$) hasta la realización del análisis⁵.

Test rápido de antígenos.

El test rápido utilizado para la validación fue el test de Linkcare Bioscreening SARS-CoV-2 Antigen Test Kit lote:20201112. El kit contiene buffer, tubo de extracción con punta dispensadora, casete e hisopo (Specimen Collection Swab type C) que ha sido sustituido por el mencionado con anterioridad a fin de realizar una óptima recogida muestra nasal⁶.

TMA.

La TMA es una técnica similar a la PCR que permite la detección de RNA del virus con mayor sensibilidad, pero no cuantificable. Utilizamos el test de Hologic SARS-CoV-2 assay para determinar y clasificar a todos los participantes con infección por SARS-CoV-2 y comparar con los resultados del test de antígeno y PCR⁷.

rt-PCR COVID.

Las PCR se realizaron con el point of care GeneXpert de Cepheid usando el test Xpert® SARS-CoV-2/Flu/RSV que combina la detección de RSV, FLU-A/B y SARS-CoV-2. Este dispositivo permitió valorar el nivel de carga vírica a partir de la cuantificación de Ct, determinando la positividad de la muestra en un Ct por debajo de 39. La PCR fue utilizada para analizar aquellas muestras discordantes entre el test de antígeno y la TMA en los que se sospechaba un falso negativo del test de antígeno o un falso positivo de la TMA⁸.

PCR panel respiratorio.

Las muestras discordantes en las que se sospechaba de un falso positivo del test de antígeno o un falso negativo de la TMA fueron analizadas utilizando la PCR de panel respiratorio Respiratory panel 2.1 plus de BIOFIRE⁹ que permite la detección de los siguientes patógenos:

Virus	Virus	Bacteria
Adenovirus	Influenza A	Bordetella parapertussis
Coronavirus HKU1	Influenza A/H1	Bordetella pertussis
Coronavirus NL63	Influenza A/H3	Chlamydia pneumoniae
Coronavirus 229E	Influenza A/H1-2009	Mycoplasma pneumoniae
Coronavirus OC43	Influenza B	
SARS-CoV-2	Parainfluenza Virus 1	
Human Metapneumovirus	Parainfluenza Virus 2	
Human Rhinovirus/Enterovirus	Parainfluenza Virus 3	
Respiratory Syncytial Virus	Parainfluenza Virus 4	

Métodos

El presente estudio evaluó el test rápido de antígeno Linkcare Bioscreening utilizando muestras clínicas de hisopos nasales anteriores y orofaríngeos. Se seleccionaron aquellas personas que acudían al punto de análisis (StopLab) de Andorra la Vella (punto habilitado por el SAAS y Ministerio de Salud de Andorra para la recogida de muestras) con sospecha de estar infectadas, ya sea por contacto con personas positivas independientemente de la sintomatología, o por sintomatología compatible con COVID, descartando a los menores de edad, personas que no disponían de seguridad social andorrana, personas que acudían por cribado laboral o personas que acudían para la obtención de certificados COVID para viajes.

Las muestras se recolectaron en el periodo de tiempo comprimido entre el 16 de febrero y el 15 de marzo. Este periodo lo podemos clasificar de baja incidencia, registrando una media diaria de 31,33 casos por 100.000 habitantes y una incidencia diaria de resultados positivos del 0,03% i una incidencia acumulada a 14 días del 0,44%.

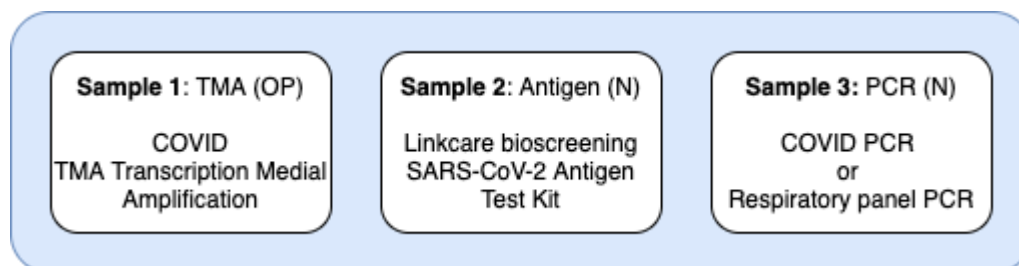


Figura 1: Muestras y orden de recogida de cada participante del estudio

A cada uno de los **147 participantes** seleccionados para el estudio se les recogieron 3 muestras con hisopo de punta redonda de fibra de rayón siguiendo el orden de la Figura 1; una muestra orofaríngea (OP) conservada en UTM para la realización de una TMA, una muestra nasal (N) para la realización del test rápido de antígeno de forma inmediata y una

muestra nasal (N) conservada en UTM para la realización de PCR panel respiratorio o PCR COVID en caso de resultado discordante entre las dos primeras pruebas siguiendo el esquema de la Figura 2.

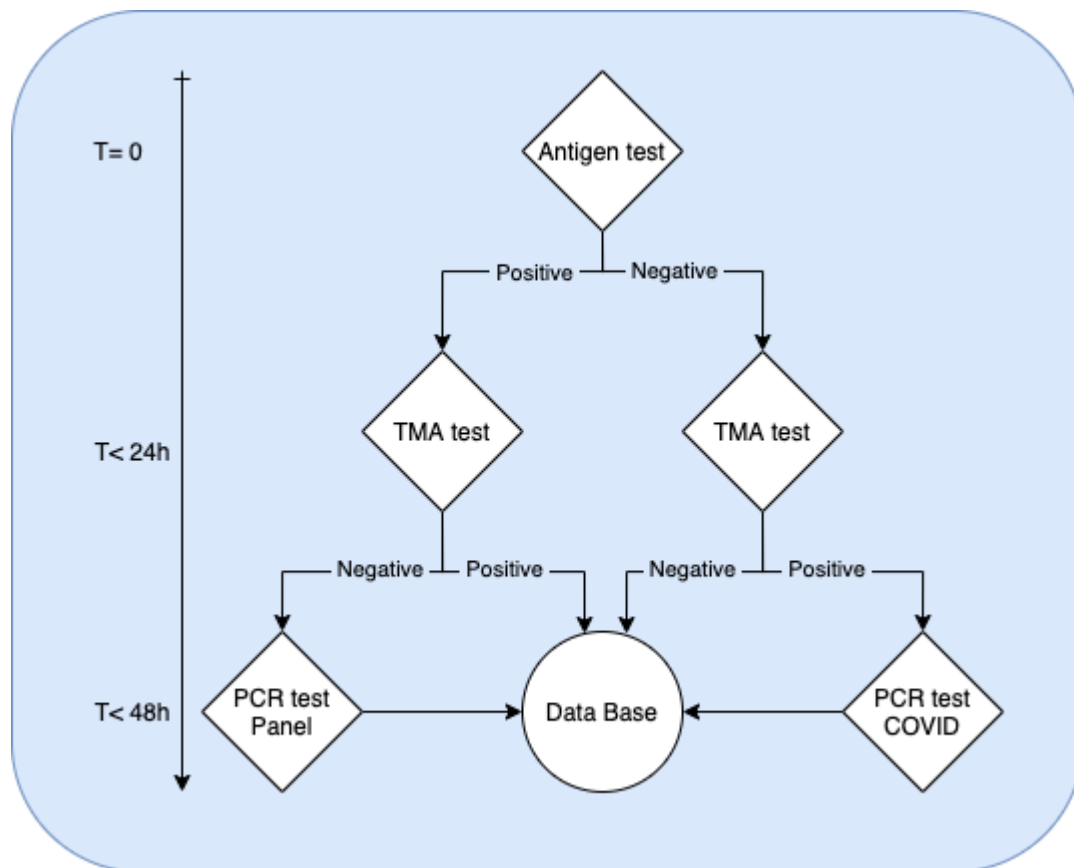


Figura 2: Árbol de decisión para la realización o no de la PCR confirmatoria de resultados discordantes negativos y positivos

Las muestras obtenidas para la realización del test de antígeno fueron procesadas de forma inmediata siguiendo las indicaciones del prospecto y realizando la lectura a los 15 minutos. Los resultados fueron anotados en hojas de datos primarios relacionando el resultado del test con el número de petición analítica de la TMA y el número de historia clínica de cada participante para recuperar la información del resultado.

Las muestras obtenidas para realizar la TMA se enviaron en un plazo inferior a 4 horas al laboratorio de análisis clínicos del HNSM, donde fueron procesadas con un tiempo inferior a 24h desde su recogida. Los resultados de las pruebas de TMA fueron incorporados a la historia clínica unificada del principado de Andorra, de donde se pudieron recuperar para ser comparados con los resultados obtenidos del test rápido de antígenos.

Las muestras de PCR fueron conservadas a temperatura refrigerada (+4°C) en el laboratorio de análisis clínicos del HNSM hasta comparar los resultados de la prueba de TMA con los resultados de la prueba del test rápido de antígenos de la marca Linkcare Bioscreening. Siguiendo el árbol de decisión preestablecido se solicitaron y procesaron todas las PCR necesarias dentro del plazo inferior a 48h. Se solicitó PCR COVID a aquellos resultados discordantes entre las dos pruebas en los que se sospecha un resultado falso negativo del test de antígenos (antígeno negativo y TMA positiva). El resultado de la PCR COVID nos permite confirmar el falso negativo del test de antígeno y determinar el nivel de carga viral detectable por el test rápido de antígeno, o confirmar el falso positivo del test TMA.

En aquellos casos en los que se observase una discrepancia entre los resultados de la TMA y del test de antígeno sospechando un falso positivo del test rápido de antígeno (antígeno positivo TMA negativa), se procedió siguiendo el árbol de decisión de la figura 2 a realizar una PCR de panel respiratorio. Los resultados del panel respiratorio realizado por PCR permiten confirmar si el resultado falso positivo es producido por otro virus respiratorio conocido que pueda estar interfiriendo en el buen funcionamiento del test rápido.

Todos los resultados obtenidos fueron almacenados en una base de datos local y privada, siendo analizados con Rstudio utilizando el paquete de análisis epidemiológico epiR para la obtención de los valores de sensibilidad y especificidad del test de antígeno.

Resultados

Un total de **147 personas** participaron en el estudio con los resultados datos brutos.

	Antígeno	PCR (Ct≤30)	PCR	TMA
Positivos totales	44	44	48	52
Negativos Totales	103	103	99	95

De estos datos hemos obtenido **10 casos discordantes** (ver table1.xls):

- 1 muestra dio resultado positivo en antígeno y negativo en TMA. En este caso se realizó la comprobación correspondiente procesando la muestra guardada como respaldo a la que se le realizó una PCR de panel respiratorio de biofire. Esta determinación no detectó ningún virus respiratorio indicando que el falso positivo del test de antígeno no se produce por una interferencia biológica conocida.
- 9 muestras fueron negativas en el test de antígeno y positivas para la TMA. De acuerdo con el protocolo establecido se usaron las muestras de PCR como respaldo para realizar el análisis de PCRs SARS-CoV-2/Flu/RSV de Cepheid con los siguientes resultados:

5 muestras positivos por PCR	4 muestras negativas por PCR
muestra 1 Ct = 32,1 muestra 2 Ct = 30,5 muestra 3 Ct = 33,9 muestra 4 Ct = 34,7 muestra 5 Ct = 31,4	muestra 1 Ct > 39 muestra 2 Ct > 39 muestra 3 Ct > 39 muestra 4 Ct > 39

Después de la descripción de los positivos pasamos a analizar la sensibilidad y especificidad del test tomando la **TMA como Gold Standard**. Observamos un valor de sensibilidad del 82.69% (CI: 69,67% - 91,77%) y de especificidad del 98.95% (CI: 94,27% - 99,97%), con un valor predictivo positivo (PPV) del 97.73% (CI: 87.98% - 99.94%) y un valor predictivo negativo (NPV) del 91.26% (CI: 84.06% - 95.93%).

Referencia TMA	Covid+	Covid-	Total
Test +	43	1	44
Test -	9	94	103
Total	52	95	147

Estimaciones con intervalo de confianza del 95%

Referencia TMA	estimado	inferior	superior
Sensibilidad	82,69	69,67	91,77
Especificidad	98,95	94,27	99,97
Valor predictivo positivo	97,73	87,98	99,94
Valor predictivo negativo	91,26	84,06	95,93

En un segundo análisis tomamos la **PCR como Gold Standard** y consideramos a seis muestras positivas por TMA como negativas, ya que la carga viral de la muestra es negativa pasados los 39 ciclos de amplificación de la PCR. Al limitar el análisis por carga vírica observamos como la sensibilidad incrementa al 93.48% (CI: 82.10% - 98.63%) y la especificidad se mantiene al 99.01% (CI: 94.61% - 99,97%).

Referencia RT-PCR	Covid+	Covid-	Total
Test +	43	1	44
Test -	5	98	103
Total	48	99	147

Estimaciones con intervalo de confianza del 95%

Referencia RT-PCR	estimado	inferior	superior
Sensibilidad	89,59	77,34	96,53
Especificidad	98,99	94,50	99,97
Valor predictivo positivo	97,73	87,98	99,94
Valor predictivo negativo	95,15	89,03	98,41

En el tercer análisis realizado consideramos exclusivamente las muestras con **carga viral (Ct ≤ 33)**, y clasificamos todas las muestras en función del resultado de la PCR determinando como muestras negativas aquellas con un Ct superiores al punto de corte.

Referencia RT-PCR (Ct ≤33)	Covid+	Covid-	Total
Test +	43	1	44
Test -	3	100	103
Total	46	101	147

Estimaciones con intervalo de confianza del 95%

Referencia RT-PCR (Ct ≤33)	estimado	inferior	superior
Sensibilidad	93,48	82,10	98,63
Especificidad	99,01	94,61	99,97
Valor predictivo positivo	97,73	87,98	99,94
Valor predictivo negativo	97,09	91,72	99,40

Por último, realizamos un cuarto análisis considerando exclusivamente las muestras **con carga viral elevada (Ct ≤ 30)**. Clasificamos todas las muestras en función del resultado de la PCR determinando como muestras negativas aquellas con un Ct superior al punto de corte. Al limitar el análisis por carga vírica observamos como la sensibilidad incrementa drásticamente al 100% (CI: 91.78% - 100%) y la especificidad se mantiene al 99.04% (CI: 94.76% - 99.98%).

Referencia RT-PCR (Ct ≤30)	Covid+	Covid-	Total
Test +	43	1	44
Test -	0	103	103
Total	43	104	147

Referencia RT-PCR (Ct ≤30)	estimado	inferior	superior
Sensibilidad	100,00	91,78	100,00
Especificidad	99,04	94,76	99,98
Valor predictivo positivo	97,73	87,98	99,94
Valor predictivo negativo	100,00	96,48	100,00

Conclusiones

Para el total del estudio concluimos que el test de Linkcare Bioscreening SARS-CoV-2 Antigen Test Kit muestra un valor predictivo positivo (PPV) muy elevado (97%) y un valor predictivo negativo (NPV) similar que se sitúa en el 91%. Los valores predictivos observados nos indican que cualquier resultado del test debemos interpretarlo con un alto grado de certeza.

Los datos de sensibilidad y especificidad presentados en el estudio revelan que el test *Linkcare Bioscreening SARS-CoV-2 Antigen Test Kit*, obtiene unos resultados muy fiables frente a los test moleculares de detección de RNA y puede ser una alternativa efectiva y económica si se realizan de forma repetitiva.

	TMA	PCR	Ct < 33	Ct < 30
Sensibilidad	82,69%	89,59%	93,48%	100.00 %
Especificidad	98,95%	98,99%	99,01%	99.04 %

El test de antígenos analizado ha demostrado que permite detectar con fiabilidad a las personas infectadas con alta carga vírica y por ende con gran capacidad infectiva. Podemos destacar el test de antígenos de *Linkcare Bioscreening SARS-CoV-2 Antigen Test Kit* como una capa de seguridad rápida y eficiente que permite detectar personas con capacidad de contagiar y, por tanto, una herramienta muy útil para coordinar acciones instantáneas que permitan actuar ante los contactos y la persona infectada.

Bibliografía

- ¹ <https://jcm.asm.org/content/58/8/e00926-20>
- ² https://www.rmlonline.com/images/data/attachments/0000/2442/SARS-CoV-2_Testing_Info_for_Clients.pdf
- ³ <https://www.fda.gov/media/136314/download>
- ⁴ <http://m.dl-goodwood.com/pid18271893/Sterile-Polyester-Tipped-Applicator-6-2-5mm-Fast-Shipping-Independent-Packing.htm>
- ⁵ <http://www.remel.com/Clinical/Microbiology/CollectionTransport.aspx>
- ⁶ <https://www.linkcare.es/product/antigen-kit/>
- ⁷ <https://www.hologic.com/hologic-products/diagnostic-solutions/hologic-sars-cov-2-assays>
- ⁸ <https://www.cepheid.com/en/tests/Critical-Infectious-Diseases/Xpert-Xpress-SARS-CoV-2-Flu-RSV>
- ⁹ <https://www.biofiredx.com/products/the-filmarray-panels/filmarrayrp/>